

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Füüsika instituut

Karoliine Kurvits

**HARULDASTE MULDMETALLIDEGA RIKASTATUD
BIOMARKERITE OPTILISTE OMADUSTE UURIMINE**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Füüsika eriala

Juhendajad:

Laurits Puust, MSc

Kerda Keevend, MSc

Yury Orlovskiy, Dr.hab., PhD

Tartu 2019

Haruldaste muldmetallidega rikastatud biomarkerite optiliste omaduste uurimine

Mikroskoopia võimaldab uurida objekte, mida inimsilm muud moodi eristada ei suuda. Väikeste objektide paremaks eristamiseks mikroskoobi piltidel kasutatakse markereid. Töö eesmärk oli uurida haruldaste muldmetallidega (RE) rikastatud nanoosakeste ($\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$, $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}\text{@SiO}_2$, $\text{c-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, $\text{YPO}_4\text{:Tb}^{3+}$) sobivust kombineeritud mikroskoopia luminesentsi markeritena ja teha selgeks, millised on nende eelised ja puudused juba olemasolevate biomarkeritega (DAPI, CPN, CdSe/CdS) võrreldes. RE dopeeritud objektide selged eelised olid nende kitsad kiirguspiigid, stabiilsus ja võrdlusobjektidest suurem intensiivsus. Kõige paremaid tulemusi andis $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$. Terbiumiga dopeeritud nanoosakesi luminesentsmarkerina kasutades tuleb meeles hoida, et alguses kiirgus tõuseb, kuna hapnik lahkub osakese pinnalt.

Märksõnad: luminesents, mikroskoopia, markerid, haruldased muldmetallid

CERCS: P260 Tahke aine: elektrooniline struktuur, elektrilised, magneetilised ja optilised omadused, ülijuhtivus, magnetresonants, spektroskoopia

Studying the characteristics of rare-earth metal doped biomarkers

Microscopy enables visualization of small objects that otherwise could not be distinguished by a human eye. For more detailed studies, special luminescent markers are used to distinguish small objects, i.e. molecules and proteins. The aim of this study was to determine the suitability of rare-earth (RE) doped nanoparticles ($\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$, $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}\text{@SiO}_2$, $\text{c-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, $\text{YPO}_4\text{:Tb}^{3+}$) as luminescent biomarkers for correlative microscopy and compare their performance to commercially available biomarkers (DAPI, CPN, CdSe/CdS). RE doped nanoparticles showed superior photostability, exhibited narrow emission lines, and had greater brightness compared to commercially available materials. $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ showed the greatest performance, however, as it was found out, terbium doped materials exhibit intensity increase overtime, which was attributed to desorption of surface-bound oxygen.

Keywords: luminescence, microscopy, markers, rare-earth metals

CERCS: P260 Condensed matter: electronic structure, electrical, magnetic and optical properties, superconductors, magnetic resonance, relaxation, spectroscopy

Sisukord

Infoleht.....	2
Sissejuhatus.....	4
Lühendid	5
1. Kirjanduse ülevaade	6
1.1 Mikroskoobid	6
1.1.1 Optiline mikroskoop	6
1.1.2 Elektronmikroskoop.....	7
1.1.3 Kombineeritud mikroskoop	8
1.2 Markerid	9
1.2.1 Orgaanilised markerid.....	9
1.2.2 Pooljuhtidest kvanttäpid.....	9
1.2.3 Konjugeeritud polümeeri kvanttäpid	10
1.2.4 Haruldaste muldmetallidega dopeeritud osakesed.....	10
1.3 Objektide valmistamine.....	10
1.4 Aparatuur ja mõõtmismeetodid	12
1.4.1 Röntgenstruktuuranalüüs	12
1.4.2 Raman spektroskoopia	12
1.4.3 Fotoluminestsentsi ergastus- ja kiirgusspektrid.....	13
1.4.4 Objektide kiirgusspektrite ja kineetikate mõõtmine	13
1.4.5 Ümbritseva keskkonna mõju luminestsentsile mõõtmine.....	14
2. Tulemused ja arutelu	15
2.1 Koostis ja struktuur	15
2.2 Ergastus- ja kiirgusspektrid.....	17
2.3 Kineetika	19
2.4 Luminestsentsi stabiilsus.....	20
2.5 Veeauru mõju luminestsentsile	22
2.6 Hapniku mõju luminestsentsile	24
2.7 Valitud osakeste uurimine CCLEMiga	25
Kokkuvõte.....	27
Summary	29
Tänuavaldused	30
Kasutatud kirjandus	31
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	35

Sissejuhatus

Suur osa meie teadmistest bioloogiliste protsesside kohta on tulnud võimekusest neid täpselt rakkudes vaadelda. Kuna mikroskoopia võimaldab uurida objekte ja protsesse, mida inimese silm muud moodi eristada ei suuda, on sellest saanud bioloogide töö lahutamatu osa [1]. Esimestes mikroskoopides kasutatud läätsede süsteemid olid kehvasti disainitud, mis tähendas, et saadud pildid olid udused ja aberratsioonidega. Alates 19. sajandi keskpaigast, mil hakati arendama uusi toimivaid objektiive, on mikroskoopia arenenud metsiku kiirusega. Täna on uurijatel võimekus juba vaadata objekte, mis on nanomeetrite suurusjärgus [2].

Et muuta väike maailm arusaadavamaks ja paremini nähtavaks, on kasutusele võetud markerid, mis lisatakse uuritavasse proovi, kus nad ergastamisel kiirgavad. Nende eesmärk on mikroskoobiga tehtud piltide lugemist hõlbustada ja võimaldada erinevate mikroskoopide kombineerimist.

Antud töö eesmärgiks oli uurida haruldaste muldmetallidega rikastatud (tetragonaalne ütriumvanaadiumoksiid ($\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$), monokliinne ütriumoksiid ($\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$), ränioksiidiga kaetud monokliinne ütriumoksiid ($\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+} @ \text{SiO}_2$), kuubiline ütriumoksiid ($\text{c-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$) ja tetragonaalne ütriumfosfaat ($\text{YPO}_4\text{:Tb}^{3+}$)) nanoosakeste sobivust kombineeritud mikroskoopia luminesentsi markeritena ja teha selgeks, millised on nende eelised ja puudused võrreldes juba olemasolevate biomarkeritega. Käesolev töö on osa suuremast uurimistööst, milles taheti välja selgitada, kas uuritavad osakesed sobivad kasutamiseks kombineeritud katoodluminesentsi mikroskoobis, mis omakorda võimaldaks teha super-resolutsiooniga mõõtmisi.

Hetkel on markerite vastupidavus mikroskoopias suurem väljakutse kui pildi resolutsioon [3]. Kombineeritud mikroskoopias kasutamiseks sobivad markerid peavad ergastuma nähtava valgusega ja elektronidega, olema stabiilsed (mitte vilkuvad ja fotopleekivad) [4,5]. Uurimisobjektideks valiti luminesceeruvad Tb^{3+} ja Eu^{3+} dopeeritud osakesed, kuna varasemalt on näidatud nende sobivust biomeditsiiniliste markeritena [6-8].

Autori panus töö valmimisel oli kõigi spektroskoopiliste ja enamiku struktuursete uuringute läbiviimine ning saadud andmete analüüs läbitöötatud kirjanduse abil.

Lühendid

FM – fluorestsentsmikroskoop

TEM – (ingl *transmission electron microscope*) läbivalgustav elektronmikroskoop

3D – kolmedimensionaalne

EM – elektronmikroskoop

2D – kahedimensionaalne

SEM – (ingl *scanning electron microscope*) skaneeriv elektronmikroskoop

CLEM – (ingl *correlated light and electron microscope*) korreleeritud valguse ja elektronmikroskoop

CL – (ingl *cathodoluminescence*) katoodluminestsents

CCLEM – (ingl *correlative cathodoluminescence electron microscopy*) korreleeritud katoodluminestsents elektronmikroskoopia

DAPI – (ingl *4',6-diamidino-2-phenylindole*) 4',6-diamiid-2-fenüliindiool

DNA – (ingl *deoxyribonucleic acid*) desoksüribonükleiidhape

CPN – (ingl *conjugated polymer nanoparticle*) konjugeeritud polümeeri nanoosake

RE – (ingl *rare-earth metal*) haruldane muldmetall

YVO₄:Bi³⁺:Eu³⁺ – vismuti ja euroopiumiga dopeeritud ütriumvanadiumoksiid

m-Y₂O₃:Tb³⁺ – terbiumiga dopeeritud monokliinne ütriumoksiid

m-Y₂O₃:Tb³⁺ @SiO₂ – ränioksiidiga kaetud ja terbiumiga dopeeritud monokliinne ütriumoksiid

c-Y₂O₃:Tb³⁺ – terbiumiga dopeeritud kuubiline ütriumoksiid

YPO₄:Tb³⁺ – terbiumiga dopeeritud ütriumfosfaat

FSP – (ingl *flame spray pyrolysis*) leeki pihustamise pürolüüs

2-EHA – (ingl *2-ethylhexanoic acid*) 2-etüülheksaanhape

XRD – (ingl *X-ray diffraction analysis*) röntgenstruktuurianalüüs

1. Kirjanduse ülevaade

1.1 Mikroskoobid

1.1.1 Optiline mikroskoop

Tänapäeval on optiline mikroskoop bioloogidele oluline tööriist, sest see võimaldab vaadelda rakke ning organelle, mida inimese silm ei suuda eraldada [1]. Ligikaudu 80% kõigist mikroskoopilistest uuringutest, mis leiavad aset bioloogias, toimuvad optiliste mikroskoopidega, sest valgusmikroskoobid võimaldavad vaadelda bioloogilisi objekte neid kahjustamata [9].

Optilise mikroskoopia kasutamise võimalused mikroobjektide uurimisel on viimase aastakümne jooksul murranguliselt arenenud. Uute fluorestsentsmikroskoopia (FM) meetodite ning sobivate markerite ülikiire areng on andnud hoogu murrangulistele teadusuuringutele ning uued suunad digitaalses pildi jäädvustamises ja andmeanalüüsis võimaldavad kiiresti ja tõhusalt analüüsida arvukaid proove [2,10].

Luminestsentsmikroskoopias ergastatakse fluorofoore laserkiirega, seejärel kogutakse ja analüüsitakse eraldunud kiirgus, mis annab hea kontrasti mittekiirgava tausta ja erksa fluorofoori vahel [2,11]. Fluorestsentsmikroskoopia on bioloogias laialt levinud, sest see võimaldab kasutada elusrakkudes fluorestsentsmarkereid, mis aitab täpselt lokaliseerida bioloogilisi struktuure, näiteks valke, aminohappeid ja lipiide [2,9,12]. Lisaks on FM kättesaadav ja lihtne kasutada [2,12]. FM võimaldab paralleelselt markeerida mitmeid molekule, mis soodustab laiapõhjalisemat arusaama bioloogilistest funktsioonidest [13].

Luminestsentsmikroskoopia on siiski mitmeid puudusi, näiteks markerite fotopleekimine, mis tähendab, et fluorestsentsmarkerid kaotavad ajas oma intensiivsuse (struktuur laguneb hapniku või ergastava kiirguse toimetel). See omakorda halvendab piltide kvaliteeti, sest signaali ja müra suhe väheneb [13]. Kuigi FM on asendamatu rakkude funktsionaalsuse uurimisel, on peamine puudus üldine konteksti puudus, sest FM mikroskoopias näeme vaid seda, mida markeerime. Seetõttu on oluline kasutada FM informatsiooni koos teiste mikroskoopia tüüpidega, näiteks skaneeriva elektronmikroskoobiga [2].

Kõige suurem fluorestsentsmikroskoopia puudus on resolutsiooni piirang, mida kirjeldas Ernst Abbe 1873. aastal. FM ei suuda anda ruumilist resolutsiooni alla objektiivi difraktsioonipiiri, mistõttu ei võimalda FM vaadelda üksikuid väikeseid objekte, sest paljud rakustruktuurid on väiksemad nähtava valguse lainepikkusest (tüüpiliste biomolekulide, sealhulgas valkude ja

aminohapete, suurus jääb alla 10 nm) [2,14,15]. Selleks on viimastel aastakümnetel töötatud välja super-resolutsiooni FM, mis aitab paremini lokaliseerida üksikuid molekule ja võimaldab vaadelda kolmedimensionaalseid (3D) struktuure. Super-resolutsiooniga luminesentsmikroskoopia on muutunud järjest populaarsemaks rakkude ja kudede uurimisel, kuid ka super-resolutsiooni FMis pole meil piisavalt konteksti. Seega tuleb leida alternatiivseid vahendeid, kuidas saadud funktsionaalne informatsioon siduda terve raku ultrastruktuuriga, et saadud infot täielikult mõista [1].

1.1.2 Elektronmikroskoop

Nagu eelnevalt mainitud, ei paku optiline mikroskoopia piisavalt head resolutsiooni, et vaadelda bioloogilisi objekte nanomeetri-skaalal. Sellisel juhul kasutatakse elektronmikroskoopi (EM), mille suurendus võrreldes optilise mikroskoobiga võib olla kuni 1000 korda suurem, kuna EMis kasutatakse kiirendatud elektrone, mille lainepikkus on väiksem kui optilises mikroskoopias kasutatavatel ergastavate footonite lainepikkused [16]. Kuna elektronmikroskoop võimaldab põhjalikumalt uurida raku struktuuri on temast viimastel aastakümnetel saanud oluline tööriist raku- ja molekulaarbioloogias [17].

Esimene elektronmikroskoop loodi aastal 1933 Ruska ja Knolli poolt [16]. Selles kasutati kiirendatud elektrone, mis läbisid õhukese proovi. Tänapäeval nimetatakse seda tüüpi mõõteseadet läbivalgustavaks elektronmikroskoobiks (*transmission electron microscopy* – TEM) [16,18]. TEM on asendamatu nanomaterjalide karakteriseerimisel, eriti osakeste kuju välja selgitamisel. Lisaks aatomresolutsiooniga võre piltidele on võimalik saada uuritava objekti kohta keemilist informatsiooni lahutusega vähemalt 1 nm, mis võimaldab lihtsasti määrata nanokristalli keemilist koostist [19]. Lisaks kahedimensionaalsele (2D) infole, on bioloogias tihti oluline visualiseerida ja konstrueerida ka bioloogilise koe 3D struktuuri. 3D-informatsiooni saamine TEMist on võimalik järjestikuste õhukeste lõigete pilte või tomograafiat kasutades [14].

Teine oluline elektronmikroskoobi tüüp on skaneeriv elektronmikroskoop (*scanning electron microscopy* – SEM), mis skaneerib fokuseeritud elektronkiirega objekti pinda ning hajunud elektronid kogutakse analüüsiks. [16]. Erinevalt TEMist on SEMi proovide ettevalmistamine lihtsam, vähem ajakulukas ja sellega on võimalik uurida paksemaid proove. Kuna uuritakse tagasi peegeldunud ja sekundaarseid elektrone, saab SEMi kasutada pinna morfoloogia ja koostise uurimiseks [18]. Mõlemal elektronmikroskoobil on resolutsioon nanomeetri skaalas,

kuid SEMil on see võrreldes TEMiga madalam. See on aga siiski piisav ja võimaldab meil vaadelda oluliselt väiksemaid objekte kui optiline mikroskoop [3].

Bioloogilise elektronmikroskoopia suurim puudus on hallskaala pildid, millelt erinevate molekulide ja organellide ära tundmine on äärmiselt keeruline. Lisaks on bioloogiliste proovide ettevalmistus keeruline ning proov võib kahjustada saada, mis omakorda tähendab, et ei saada täielikku informatsiooni [3,4].

1.1.3 Kombineeritud mikroskoop

Suur valik markereid ja sonde võimaldavad fluorestsentsmikroskoobiga uurida elusolendite rakke ja neis olevaid struktuure, kuid nähtavad on vaid markeeritud molekulid. Elektronmikroskoop võimaldab meil detailselt näha rakkude alamstruktuure, kuid saadud pildid on vaid hallskaalal, millelt on spetsiifilisi molekule keeruline ära tunda. Valgus- ja elektronmikroskoobid on asendamatud bioloogias, kuid tihti jääb vaid ühe meetodiga saadav info väheks. Mõlema meetodi eeliseid saab kasutada korreleeritud valgus- ja elektronmikroskoopias (*correlated light and electron microscopy* – CLEM). Hiljutised arengud sondide välja töötamises, proovide ettevalmistamises, superresolutsiooniga FMi välja töötamises, piltide ühitamises ja tulemuste analüüsimises on selle meetodi arengule palju kaasa aidanud [4].

Tavalised FM protseduurid ja EM ettevalmistused on sageli üksteisega vastuolus: fluorestsentsmikroskoopia eeldab leebaid meetodeid, samal ajal kui elektronmikroskoopia eeldab raskemetallide kasutamist, mis tihti kustutab fluorofooride kiirguse. Seega on CLEMi kasutades vaja objektide ettevalmistamisele eraldi tähelepanu pöörata ja leida markerid, mis sobiksid CLEMis kasutamiseks [4].

SEMi ja katoodluminesentsi (*cathodoluminescence* – CL) kombineerimisel saadakse korreleeritud katoodluminesents elektronmikroskoopia (*correlative cathodoluminescence electron microscopy* – CCLEM), kus kiirendatud elektronid kutsuvad materjalis või markerites esile luminesentskiirguse. Sellisel juhul saadakse ühest mikroskoobist nii luminesentspilt kui ka elektronmikroskoobi pilt. Optilise CLi korral uuritakse proovi optilises mikroskoobis ja ergastatakse katoodi ja anoodi vahele tekkiva elektronikiirga. Sellisel lähenemisel saame pildi, mis võrreldes CCLEM lähenemisega on väiksema suurenduse ja madalama resolutsiooniga [20]. Ometi ei ole traditsioonilised CLEMi markerid sobivad katoodluminesentsi jaoks, sest fotopleegivad kiirendatud elektronide all kiiresti, ning seetõttu on viimasel ajal hakatud uurima uusi sobilikke materjale CCLEMi jaoks [21].

1.2 Markerid

Markerid on lisandid, mis aitavad välja tuua konkreetsete molekulide asukohad proovis. Kasutatav marker kinnitub oma funktsionaalsuse tõttu sobiva molekuli külge. Markerit valides tuleb fluorestsentsmikroskoopias arvestada nii sobiva ergastava lainepikkusega kui ka piisava kvantsaagisega [2]. Biomarker on lisand, mida on võimalik kasutada kudede, rakkude ja teiste bioloogiliste süsteemide uurimiseks nii, et marker ise ei kahjusta objekti [22].

1.2.1 Orgaanilised markerid

Orgaanilised molekulid (markerid) on peamiselt süsinikust, vesinikust ja lämmastikust koosnevad molekulid, mis kiirgavad laseriga ergastades valgust nähtavas spektrialas. Üks levinumaid markereid on näiteks 4',6-diamiid-2-fenüüliindool (DAPI). DAPI seostub DNAGA, mis võimaldab lokaliseerida rakutuumasid. DAPI on äärmiselt levinud luminescentsmikroskoopias oma stabiilsuse tõttu, kuid elektronmikroskoobi all kustub kiirgus äärmiselt kiiresti. DAPIt on CLEMis võimalik kasutada, kasutades esmalt luminescentsmikroskoopiat ning seejärel elektronmikroskoopiat. DAPI on mürgine ning seda saab kasutada ainult fikseeritud rakkudes [4].

1.2.2 Pooljuhtidest kvanttäpid

Pooljuhtidest kvanttäpid on 10 kuni 30 nm suurused pooljuhist nanoosakesed, mis ergastamisel kiirgavad. Nende kiirgusspektri piigi asukoht sõltub osakese suurusest ning luminescentsi kustumisaeg jääb keskmiselt 20 mikrosekundi juurde [23,24].

Pooljuhtidest kvanttäppe on võimalik kasutada nii fluorestsents- kui ka elektronmikroskoopias [4]. Levinumad kvanttäppide sünteesimeetodid tagavad nanoosakesed, mis on ainult disperseeritavad orgaanilistes lahustes, kuid viimasel ajal välja töötatud pinna funktsionaliseerimise meetodid võimaldavad nende pinnale kinnitada ka polümeere, proteiine, peptiide või teisi hüdrofiilseid molekule. See võimaldab neid kasutada vesilahustes, mis laiendab nende kasutusvõimalusi bioloogias [25]. Kvanttäpid on elusrakkudele mürgised, kuid neid saab kasutada, kui muutapooljuhtidest kvanttäpid DNA-ga mitte reageerivaks või kasutada neid fikseeritud rakkudes [23].

Pooljuhtidest kvanttäppide kiirgusspektrid on kitsad ja meenutavad Gaussi kõveraid, samal ajal kui orgaaniliste molekulide kiirgusspektri jooned on laiad ja lauged. Lisaks pleegivad pooljuhtidest kvanttäpid laseri all vähem kui orgaanilised markerid. Samas on neil omadus

vilkuda – luminestsentskiirguse vahele tekivad pikad mitte kiirgamise perioodid, mis segavad luminestsentsi stabiilsust [26].

1.2.3 Konjugeeritud polümeeri kvanttäpid

Konjugeeritud polümeerid on orgaanilised makromolekulid, mida iseloomustavad järjestikused vahelduvad üksik- ja kaksiksidemed. Viimasel kümnendil on fluorestseeruvate markeritena populaarsust kogunud konjugeeritud polümeeride baasil tehtud kvanttäpid (*conjugated polymer nanoparticles* – CPN). Nad on efektiivsed kiirgajad, fotostabiilsed, lühikese kustumisajaga (~10 mikrosekundit), mittevilkuvad ja madala mürgisusastmega [27,28]. Suurim probleem on nende madal hüdrofiilsus, mis teeb nende kasutamise biomarkeritena keeruliseks [27]. Lisaks on nad pooljuhist kvanttäppide ja orgaaniliste markerite nanoosakestest suuremad, jäädes 30 nm ja 500 nm vahemikku [28].

1.2.4 Haruldaste muldmetallidega dopeeritud osakesed

Viimasel ajal on mitmed uuringud keskendunud luminestseeruvate haruldaste muldmetallidega (*rare-earth* – RE) dopeeritud ühendite loomisele [8,29]. Sellistel ühenditel on anorgaanilise ühendi maatriks ja haruldaste muldmetallide optilised omadused. Haruldase muldmetalliga dopeeritud nanoosake on kasutatav luminestseeruva markerina bioloogilistes või ravimiuuringutes, kui sellel on defineeritud eredus, neelduv lainepikkus, luminestsentsi eluiga, erinevate mõõteriistade kasutamise sobilikkus, stabiilsus, lipofiilsus või hüdrofiilsus, fotopleekimine, konjugatsioonikeemia ja praktiline sünteesimise võimalus [29].

Erinevalt kvanttäppidest ei sõltu kiiratav lainepikkus osakeste suurusest, mis tähendab, et süntees ei pea olema nii karmilt kontrollitud. Võrreldes orgaaniliste markerite ja kvanttäppidega on haruldaste muldmetallidega dopeeritud nanoosakeste luminestsentsi eluiga pikem ning kiirguspiigi asukohta on lihtne muuta, vahetades haruldast muldmetalli nanoosakese maatriksis või seda ümbritsevat maatriksit [30,31]. Tänu väga kitsastele piikidele on võimalik paralleelselt kasutada mitut markerit. Orgaanilised markerid ja kvanttäpid on juba lihtsasti kättesaadavad, põhjalikult uuritud ning nende sünteesimiseks on olemas efektiivsed meetodid. RE dopeeritud nanoosakeste kasutamine, omadused ja efektiivne valmistamine on veel uurimisjärgus [31].

1.3 Objektide valmistamine

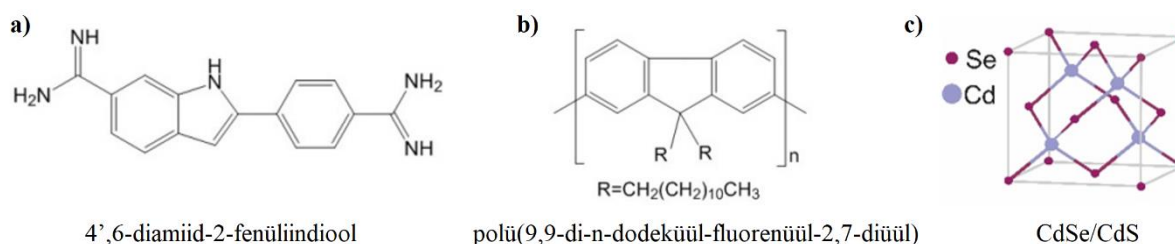
Kõik nanoosakesed – tetragonaalne ütriumvanaadiumoksiid ($\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$), monokliinne ütriumoksiid ($\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$), ränioksiidiga kaetud monokliinne ütriumoksiid

($m\text{-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+} @\text{SiO}_2$), kuubiline ütriumoksiid ($c\text{-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$) ja tetragonaalne ütriumfosfaat ($\text{YPO}_4\text{:Tb}^{3+}$) – sünteesiti leeki pihustamise pürolüüsiga (*flame spray pyrolysis* - FSP) [30,32]. Ränioksiidiga kaetud osakesed ühilduvad biomolekulidega veel paremini kui katmata osakesed [30]. Mõlemat tüüpi osakesed on esindatud, et oleks võimalik võrrelda nende luminesentsi omadusi.

$\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$ sünteesis lisati Y, V, Eu ja Bi lähteainete stöhhiomeetrilised kogused lahustisse (2-etüülheksaanhape (*2-ethylhexanoic acid* – 2-EHA) ja atseetanhüdriid suhtes 2:1) hoides metalli kontsentratsiooni 0.4 M. Esmalt lisati lahustisse V ja Eu ning segati 100 °C juures 3 tundi. Y ja Bi lahustati lahustis toatemperatuuril. Kõik lähteainete lahused aeti läbi veega jahutatud pihustusotsiku ja hajutati O_2 -ga (otsiku otsas rõhk umbes 1.5bari) väikesteks tilkadeks. Saadud piisad süüdati metaani ja hapniku segus (1.5 L/min ja 3.2 L/min), mis oli ümbritsetud 40 L/min liikuva hapnikuga. Sünteesitud pulber koguti tulest eemale paigutatud filtrilt [7,32].

Monokliinse ütriumoksiidi nanoosakeste sünteesiks lahustati ütriumnitraat 2-etüülheksaanhape ja etanooli segus (1:1) hoides metalli kontsentratsiooni 0.5 M. Terbiumnitraat lahustati eelnevalt nimetatud 2-EHA ja atseetanhüdriidi lahuses. Lahused lasti läbi pihustusotsiku voolukiirusel 5 mL/min ja hajutati 5 L/min liikuva hapnikuga. Taas koguti pulber filtrilt [32]. $M\text{-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+} @\text{SiO}_2$ nanoosakesed suunati enne filtrile jõudmist läbi rõnga, kus nad kaeti heksametüüldisiloksaani auruga. Kuubilise ütriumoksiidi nanoosakesed sünteesiti samal põhimõttel nagu $m\text{-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, kuid lahust lasti läbi pihustusotsiku kiirusel 11.6 mL/min ja segati 3L/min liikuva hapnikuga [30]. $\text{YPO}_4\text{:Tb}^{3+}$ nanoosakeste sünteesimisel lahustati ütriumnitraatheksahüdraat ja terbiumnitraatheksahüdraat etanooli ja 2-EHA 1:1 lahuses. Seejärel lisati tributüülfosfaat. Metalli kontsentratsioon hoiti 0.4M. Lahus lasti läbi pihustiotsiku (5mL/min) ja hajutati hapnikuga (5 L/min) [33].

Võrdlusobjektidena kasutati kommertsiaalselt saadavaid biomarkereid 4',6-diamiid-2-fenüüliindool (DAPI) (Joonis 1a), polü(9,9-di-n-dodeküül-fluorenyül-2,7-diüül) (konjugeeritud polümeerist kvanttpid (CPN)) (Joonis 1b) ja CdSe/CdS (pooljuhist kvanttpid) (Joonis 1c).



Joonis 1. a) DAPI, b) CPN, c) pooljuhist kvantttäppide struktuurid [32].

Terbiumiga dopeeritud nanoosakesed valmistasid Dr. Fabian Starsich ja Martin T. Matter ETH Zürichi osakestetehnoloogia laboris. Euroopiumiga dopeeritud nanoosakesed valmistas Dr. Anastasia Spyrogianni ETH Zürichis ja nende väljatöötamist koordineeris Prof. Georgios Sotiriou Rootsi Karolinska Instituudi mikrobioloogia, kasvajate ja rakubioloogia osakonnast.

1.4 Aparatuur ja mõõtmismeetodid

1.4.1 Röntgenstruktuuranalüüs

Optiline lahutusvõime piirab kristalli struktuuri uurimist optilise mikroskoobiga. Seega kasutatakse kristalli struktuuri uurimiseks enamasti röntgenstruktuuranalüüsi (*X-ray diffraction analysis* – XRD). Objektile langev röntgenkiirgus on vastastikmõjus aatomitega ja difrageerub. Uurides tekkinud difraktsiooni pilti, saame kokku panna aatomite paigutuse ja tuvastada aine kristallstruktuuri [34].

XRD mustrid jäädvustati ETH Zürichi osakestetehnoloogia laboris Bruker D8 diffraktomeetriga (40 kV, 40 mA, CuK α kiirgus) [32].

TEM pildid RE³⁺ elementidega dopeeritud nanoosakestest on tehtud JEOL 2200 TEMiga kiirenduspingel 200 kV.

1.4.2 Raman spektroskoopia

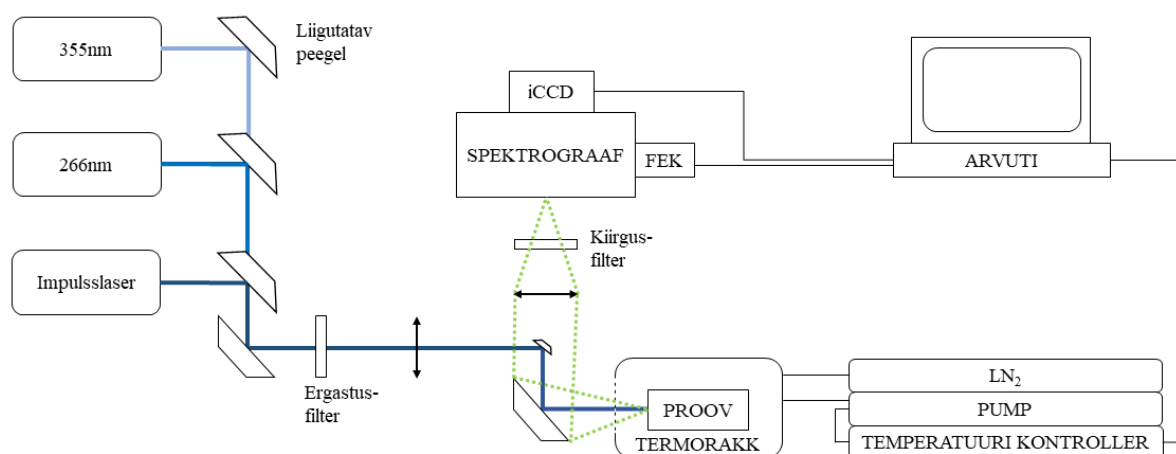
Objektide kristallstruktuuride kontrollimiseks teostati ka Raman analüüs, kuna mõned kristallstruktuuride tüübid ei ole piisavalt eristatavad XRD meetodiga. Proovi kiiritati laserkiirega ning proovilt hajunud valgus suunati detektorile. Raman mõõtmised teostati Renishaw inVia micro-Raman spektromeetril (spektraal resolutsioon 2 cm⁻¹), millel on ergastamiseks 514 nm argoon-ioon laser ja 50 \times suurendusega objektiiv, mis fokuseerib laseri objektile ning kogub kokku Raman signaali.

1.4.3 Fotoluminestentsi ergastus- ja kiirgusspektrid

Objektide ergastamiseks sobiva valgusallika valimiseks mõõdeti esmalt markerite ergastus- ja kiirgusspektrid. Proovi spektrite mõõtmiseks kasutati markerite pulbrilist kuju, mis pandi kvartsküvetiga täisautomaatsesse ristuva geomeetriaga Horiba Fluoromax-4 spektrofluorimeetrisse. Kiirguse filtreerimiseks asetati monokromaatori ette sobiv ribapääsu filter, ergastuse monokromaatori ette sobiv madalpääsu filter ja saadud spektrit parandati vastavalt aparadi spektraalsele tundlikusele. Masina ergastusallikaks on Xe-lamp võimsusega 150 W ning detektoriks fotoelektronkordisti footonite loendusrežiimis. Spektrid mõõdeti nähtava valguse piirkonnas, et leida sobiv lainepikkus optilise mikroskoobi all kasutamiseks.

1.4.4 Objektide kiirgusspektrite ja kineetikate mõõtmine

Objektide kiirgusspektreid ja kineetikaid uuriti TÜ Füüsika Instituudi laserspektroskoopia laboris konstrueeritud katseseadmega (Joonis 2). Kiirgusspektrite mõõtmisel kasutati ergastamiseks Nd:YAG (266 nm, 1.53 mW) laserit või Nd:YAG (355 nm, 47 mW) laserit. Kineetikate mõõtmisel kasutati impulsslaserit Ekspla NT340 (pulsi pikkus 20 ns), mis pandi väljastama sobivat lainepikkust vastavalt objektile. Laserkiir juhiti peeglitega termorakus asuvale proovile ja fokusseeriti ~1 ruutmillimeetri suuruseks. Laserkiire puhastamiseks kasutati sobivat madalpääsu filtrit. Proovist kiirgunud luminescentskiirgus suunati läbi kõrgpääsufiltri spektrograafi Andor Shamrock 303i sisendpilule. Spektrograaf oli varustatud Hamamatsu H8259 fotoelektronkordistiga (FEK), mis võimaldas mõõta kiirguse kineetikat, ja Andori iCCD kaameraga, mis võimaldas registreerida spektreid.



Joonis 2. Katseseadme skeem.

Üks kiirgusspektri mõõtmise tsükkel kestis 24 minutit, mille jooksul salvestati iga 3 minuti järel spekter (kokku 8 mõõtmist tsüklis). Esimesed 15 minutit oli laser pidevalt proovil. 15

minuti täitumisel võeti viies spekter ning seejärel laser blokeeriti. Tsükli viimasel 9 minutil pandi laser tööle vaid mõõtmiseks (~10 sekundit korraga). Sellist tsüklit kasutati stabiilsuse uurimiseks, et saada teada kuidas osakesed reageerivad pidevale laserkiirgusele – kas ja kui intensiivselt toimub fotopleekimine või hakkab intensiivsus hoopis kasvama. Tsükli teise osaga taheti teada saada, kas protsess on pöörduv või mitte.

Võrdluseks kasutatav DAPI kustumisaeg mõõdeti Šveitsis Horiba Delta Proga, mis kasutab NanoLED-370 ergastust lainepikkusega 366 nm ja pulsi pikkusega 1.4 nanosekundit.

1.4.5 Ümbritseva keskkonna mõju luminescentsile mõõtmine

Keskkonnast sõltuva luminescentsi mõõtmised teostati linkam THMS350V kambris, mis oli hermeetiliselt suletud. Ergastav laser oli Nd:YAG laser (355 nm), mis annab nanosekundilisi impulsse kordussagedusega 5 kHz ja mille puhastamiseks kasutati UFS-5 filtrit. Luminescentskiirgus puhastati ŽS-10 filtriga ning suunati LOMO MDR-23 monokromaatorile. Spektri registreeris Andor DE240-BU CCD-kaamera.

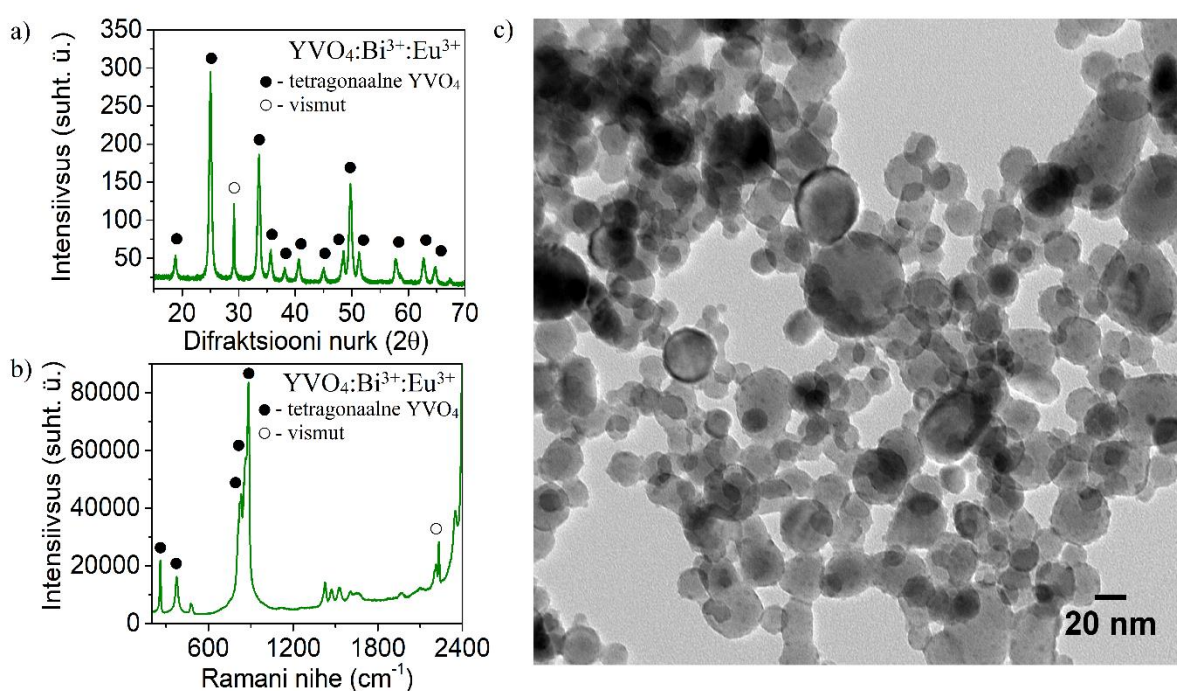
Kambrist voolasid kordamööda läbi hapnik ja lämmastik, mis olid puhtusega 99.999%. Kambrisse voolavate gaaside kontsentratsioone määrati Brooks SLA5850 massivoo kontrolleriaga, mis hoidis voolu kiirust 200 milliliitrit minutis.

Et vabaneda tableti pinnale kogunenud veest, kuumutati objekt enne mõõtmist lämmastiku keskkonnas 150 kraadini. Stabiliseerimiseks hoiti objekti enne sensorkoste mõõtmist 10 minutit lämmastikus.

2. Tulemused ja arutelu

2.1 Koostis ja struktuur

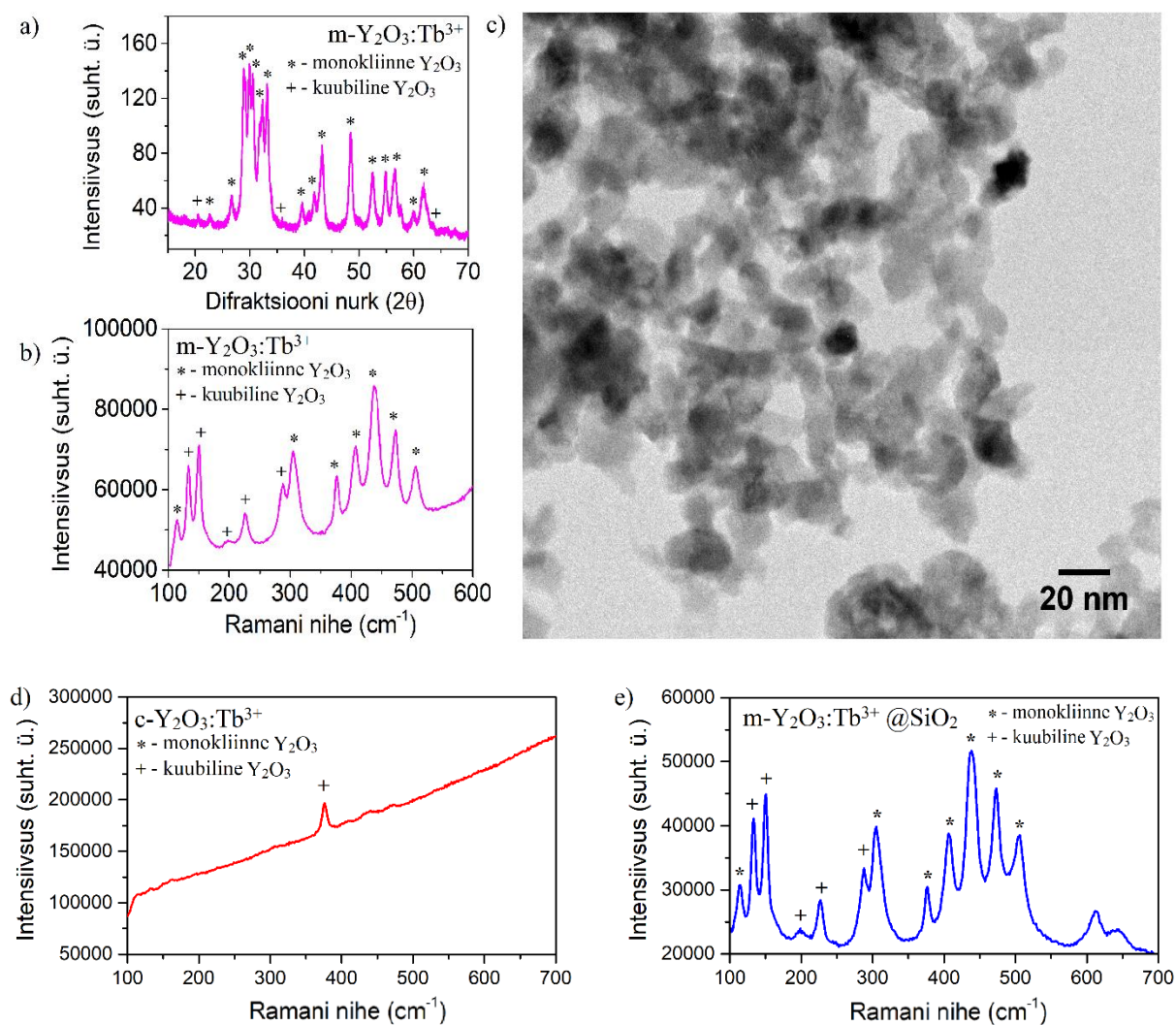
Objektide kristallstruktuure hinnati XRD ja Raman analüüsi kaudu. Tulemustest võime näha, et $\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$ kristallstruktuur on tetragonaalne. Samas on selgelt näha piik, mis ei kuulu tetragonaalse YVO_4 piikide hulka, kuid kattub täpselt vismuti nanoosakese piigiga [35-37]. Seega ei ole osa vismutist maatriksi sees, vaid on välja sadestunud (Joonis 3a-b). TEMi piltidelt on näha, et valdavalt on tegemist sfääriliste, kuid leidub ka ellipsoidilisi osakesi. Nende suurus on 20 kuni 40nm.



Joonis 3. $\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$ nanoosakeste a) XRD muster, b) Raman analüüs ja c) TEM pilt.

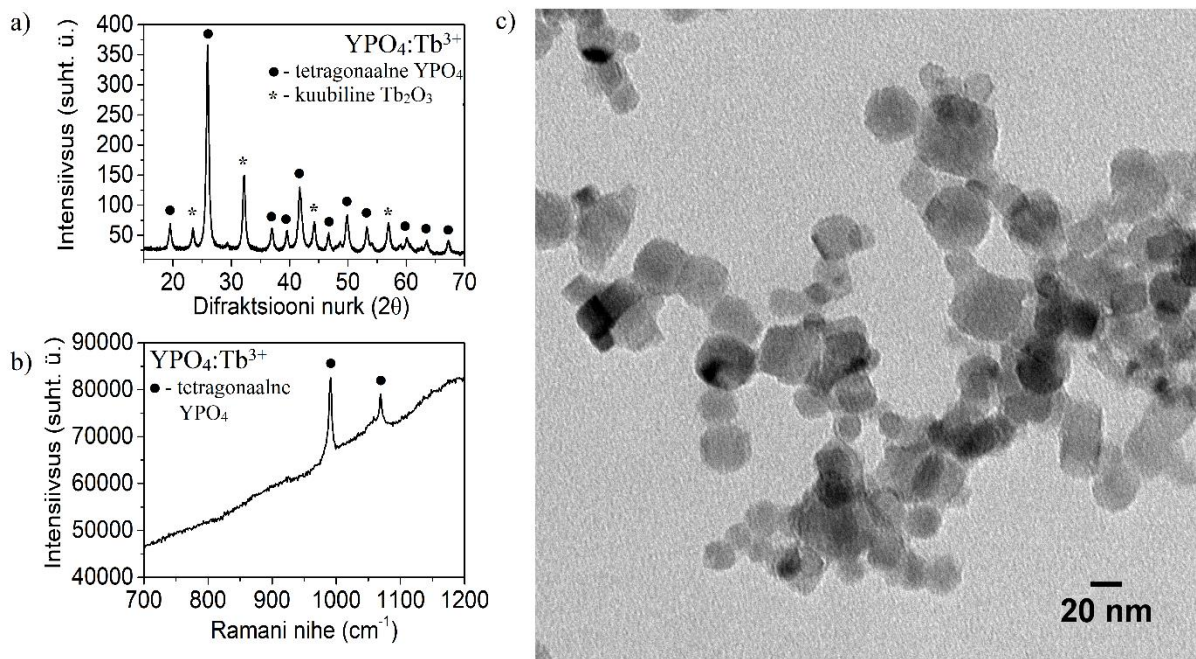
Monokliinsete $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ nanoosakeste XRD ja Raman analüüs näitab, et osakesed on peamiselt monokliinse faasiga, kuid leidub ka kuubilist faasi (Joonis 4a, Joonis 4b) [38-41]. Sama tulemuse annab m- $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ @ SiO_2 osakeste Raman analüüs (Joonis 4e). c- $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ Raman analüüs (Joonis 4d) näitab, et tegemist on puhtalt kuubiliste osakestega. TEMi piltide analüüs näitab, et m- $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ nanoosakesed on ebaühtlase kujuga osakestega, mille keskmine suurus on 20 nm.

Monokliinse ja kuubilise $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ Raman analüüsil (Joonis 4b, Joonis 4d) on näha ka tugev taustkiirgus, mida tuleneb proovi omakiirgusest. Samasugune tõus on ka $\text{YPO}_4\text{:Tb}^{3+}$ nanoosakese Raman analüüsil (Joonis 5b) [42].



Joonis 4. $m\text{-Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+}$ nanoosakeste a) XRD analüüs, b) Raman analüüs, c) TEM pilt, d) $c\text{-Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+}$ Raman analüüs ja e) $m\text{-Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+}@\text{SiO}_2$ Raman analüüs

Sünteesitud $\text{YPO}_4:\text{Tb}^{3+}$ nanoosakeste XRD mustrit (Joonis 5a) vaadates on näha, et suurem osa piike kattuvad tetragonaalse paigutusega, kuid leiduvad ka kaks piiki, mis ei kuulu tetragonaalsesse struktuuri [43]. Asukohtade poolest sobivad piigid kokku kuubilise terbiumoksiidi XRD analüüsiga [44]. Raman analüüs näitab vaid tetragonaalse struktuuri piike [45]. Osakeste suurus on 20 kuni 30 nm.

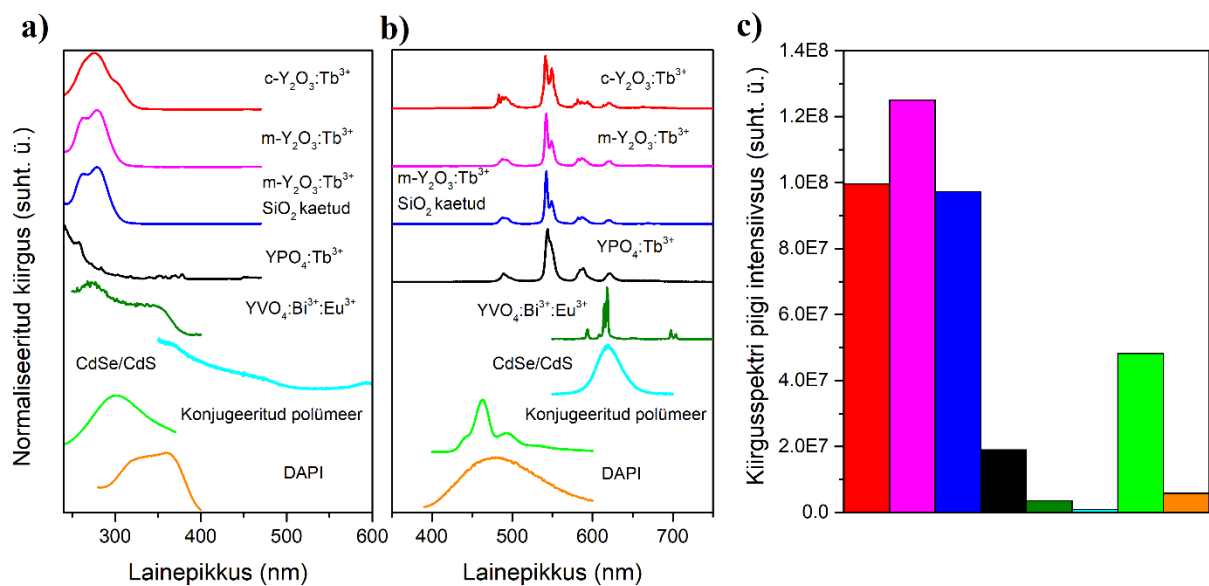


Joonis 5. Tetragonaalsete $\text{YPO}_4\text{:Tb}^{3+}$ nanoosakeste a) XRD analüüs, b) Raman analüüs ja c) TEM pilt

2.2 Ergastus- ja kiirgusspektrid

Sobivate ergastuslainepikkuste kindlaks tegemiseks uuriti kõigepealt objektide ergastus- ja kiirgusspektreid. Ergastusspektrid on iga objekti jaoks mõõdetud kiirgusspektri maksimumile vastavale lainepikkusele – terbiumiga dopeeritud nanoosakestel 542 nm, euroopiumiga dopeeritud osakesel 612 nm, CdSe/CdS nanoosakestel 619 nm, CPN 463 nm, DAPI-l 457 nm. Uuritav ergastuslainepikkuste vahemik valiti 250 nm kuni 600 nm, sest just sellesse vahemikku jäävaid lasereid kasutatakse optilises mikroskoopias.

Joonis 6 kõigi kolme alamjoonise peal on objektide järjekord sama – c- $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, m- $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, m- $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ @ SiO_2 , $\text{YPO}_4\text{:Tb}^{3+}$, $\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$, CdSe/CdS, CPN ja DAPI.



Joonis 6. Uuritavate objektide ja kommersiaalsete biomarkerite normeeritud a) ergastus- ja b) kiirgusspektrid ning c) kiirgusspektrite piikide intensiivsused.

Kõigi uuritavate RE dopeeritud nanoobjektide ergastamiseks sobib laser lainepikkusega 266 nm (Joonis 6). Võrreldes kommersiaalsete markerite ergastusspektritega on RE dopeeritud nanoosakeste ergastusspektrite piigid sügavamal UV-piirkonnas. YPO₄:Tb³⁺ ergastusmaksimum jääb täielikult UV-piirkonda. YVO₄:Bi³⁺:Eu³⁺, c-Y₂O₃:Tb³⁺, m-Y₂O₃:Tb³⁺ ja m-Y₂O₃:Tb³⁺@SiO₂ maksimumid on UV-piirkonnas, kuid jäävad siiski uuritud lainepikkuste vahemikku. See teeb nende kasutamise optilises mikroskoobis keerulisemaks, kuna seal eelistatakse kasutada suurema lainepikkusega lasereid, sest UV kiirgus kahjustab elusaid rakke. Lisaks on sellisel juhul vaja kasutada kvartsist optilisi elemente, mis teeks kogu süsteemi kallimaks [46]. Samas on bioloogilistes uuringutes kasutusel oleva CPN piik samuti 300 nm juures, mis tähendab, et ergastava lainepikkuse poolest võivad RE dopeeritud osakesed optilise mikroskoobiga kasutamiseks siiski sobida. Kõige paremini võiksid sobida m-Y₂O₃:Tb³⁺, m-Y₂O₃:Tb³⁺@SiO₂ ja c-Y₂O₃:Tb³⁺, sest nad ergastuvad alates kolmesajast nanomeetrist ning nende intensiivsused on kõige suuremad. Lisaks võib UV-kiirguses ergastumine tähendada sobiva ergastusmaksimumi olemasolu katoodluminesentsiks.

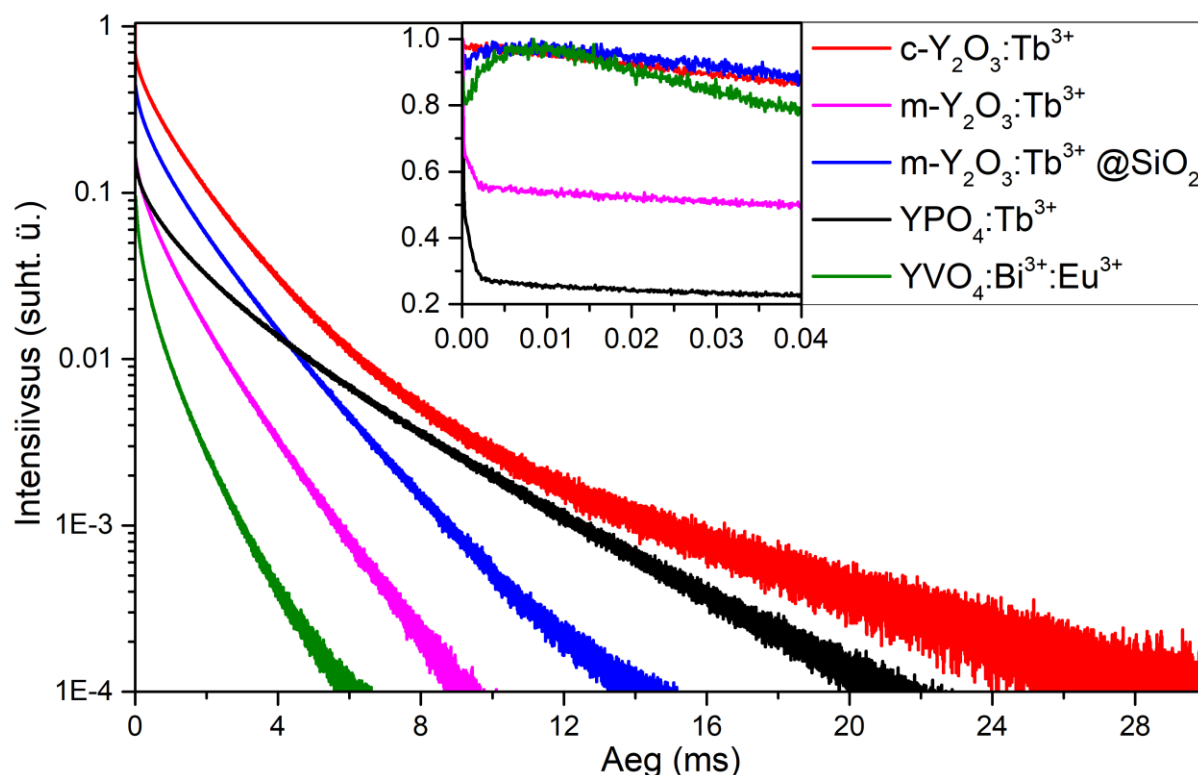
SiO₂-ga kaetud m-Y₂O₃:Tb³⁺ ja katmata m-Y₂O₃:Tb³⁺ ergastusspektrid kattuvad kujult, kuid normeerimata intensiivsuseid vaadates on näha, et katmata m-Y₂O₃ kiirgab intensiivsemalt. Võrdlusobjektidest on kõige intensiivsema kiirgusega CPN, millest ütriumoksiidi nanoosakesed kiirgavad 2 korda tugevamalt.

Uuritavate haruldaste muldmetallide selge eelis võrreldavate objektide ees on nende kiirgusspektrite kitsad piigid, mis aitavad neid lihtsalt eristada taustkiirgusest, mis bioloogilistes objektides leidub proovi ettevalmistuse tõttu [42].

2.3 Kineetika

Markerite kasutamisel katoodluminesents mikroskoobis on oluline, kui kiiresti saab markerid skaneerida. Sobiva skaneerimiskiiruse määrab lumineseerivate osakeste kustumisaeg, sest pildi kvaliteet halveneb märgatavalt, kui liigutakse järgmisesse punkti, aga eelmise objekti järelhelendus veel kestab. Kuigi SEMis ergastatakse markereid elektronidega, mille tulemusel toimub katoodluminesents, uuriti töös objektide kustumist fotoluminesentsil. Nimelt ei ole katoodluminesentsi kustumisaja mõõtmise süsteem laialt levinud ning kättesaadav. Samas on katoodluminesentsi ja fotoluminesentsi ergastusprotsessid piisavalt sarnased, et fotoluminesentsi kustumisaja põhjal teha oletusi katoodluminesentsi kustumisaja kohta [47].

Kineetika mõõtmisel detekteeriti intensiivsust objekti kiirguspiigi lainepikkusel. $\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$ detekteeritav valgus oli lainepikkusel 612 nm, $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}\text{@SiO}_2$, $\text{c-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ ja $\text{YPO}_4\text{:Tb}^{3+}$ kogutav valgus lainepikkusel 542 nm. Lisaks ergastati kõiki objekte nende ergastusspektri maksimumile vastava lainepikkusega – $\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$ ergastati lainepikkusel 275 nm, $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ ja $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}\text{@SiO}_2$ lainepikkusel 279 nm, $\text{c-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ lainepikkusel 277 nm ja $\text{YPO}_4\text{:Tb}^{3+}$ lainepikkusel 258 nm. Ergastuse maksimumis mõõdeti, et saada kõige rohkem signaali.



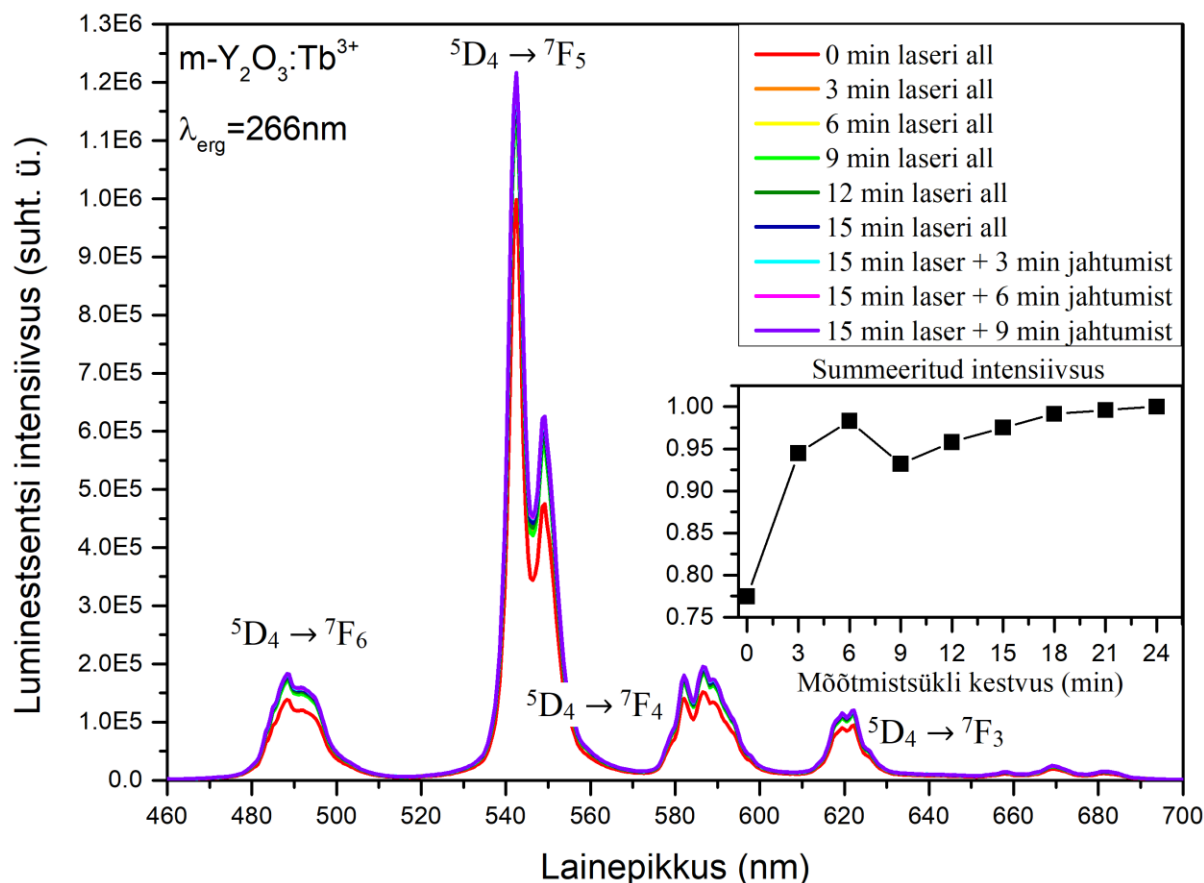
Joonis 7. Uuritavate objektide kineetikad ja mõõtmiste esimesed 0.04ms.

Tulemustest on näha, et kõige kiiremini kustub YVO₄:Bi³⁺:Eu³⁺ (Joonis 7), mille luminesentsi võib lugeda kustunuks 8 millisekundit pärast ergastamist. Terbiumiga rikastatud nanoosakeste kustumisaeg on märgatavalt pikem, kusjuures kõige pikema järelhelendusega on c-Y₂O₃:Tb³⁺ nanoosakesed. Vaadates graafiku esimest 0.04 millisekundit, on näha, et c-Y₂O₃:Tb³⁺, m-Y₂O₃:Tb³⁺ ja YPO₄:Tb³⁺ osakesed hakkavad kohe intensiivsust kaotama, kuid YVO₄:Bi³⁺:Eu³⁺ ja m-Y₂O₃:Tb³⁺@SiO₂ intensiivsus seevastu alguses tõuseb. Tõusu võib põhjustada viivitus osakeste ergastumises.

Võrreldes RE dopeeritud osakestega on võrdlusobjektide kustumisajad oluliselt lühemad. DAPI kustumisaeg on 2 nanosekundit, CPNil 10 mikrosekundit ja CdSe/CdS osakestel 20 mikrosekundit [24,32]. Kuigi RE lisandiga osakestel on pikem kustumisaeg, on see CCLEMis kasutamiseks siiski sobivas suurusjärgus [32].

2.4 Luminesentsi stabiilsus

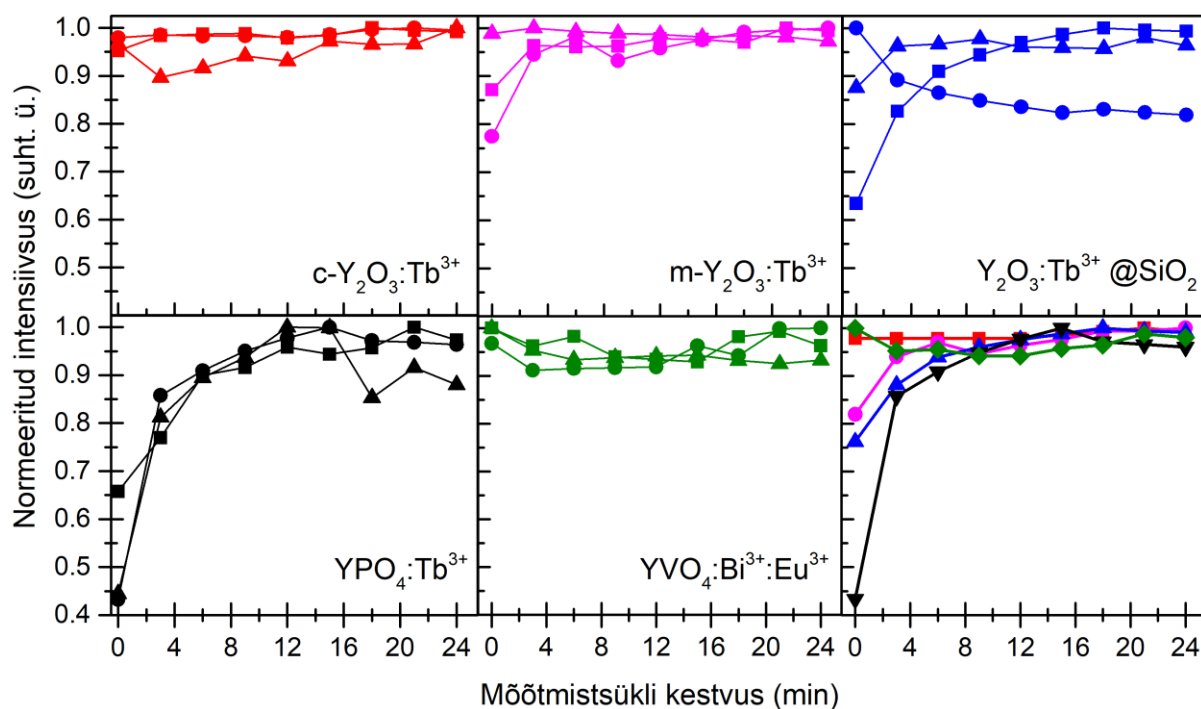
Luminesentsi stabiilsust uuriti, et näha võimalikku pöörduvat või mittepöörduvat fotopleekimist objektides. Luminesentsi stabiilsust uuriti RE dopeeritud ja konjugeeritud polümeeri nanoosakestel kasutades 266 nm laserkiirgust. DAPI ja CdSe/CdS nanoosakeste ergastamiseks kasutati 355 nm lainepikkusel laserit.



Joonis 8. Monokliinse $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+}$ luminesentsi intensiivsuse stabiilsus ühes mõõtmistsükli.

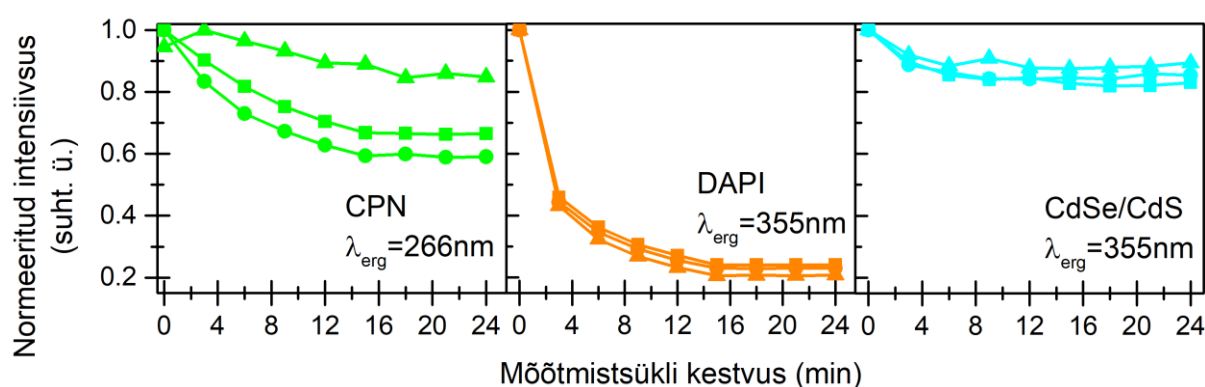
Joonis 8 kujutab ühe mõõtmistsükli tulemusi $m\text{-Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+}$ jaoks ühes punktis. Vaadates spektrit on selgelt ära tuntavad terbiumi üleminekud. Terbiumi kiirguse luminesentsi intensiivsus muutub intensiivsus tsükli jooksul märgatavalt. Et saada ettekujutus kogu objekti käitumisest, tehti selliseid mõõtmistsükke iga objekti jaoks kolmes erinevas punktis.

Mõõtmistulemused (Joonis 9) näitavad, et RE lisandiga nanoobjektidel fotopleekimist ei toimu, sest luminesentsi intensiivsus ei kahane ajas. $c\text{-Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+}$ ja $\text{YVO}_4:\text{Bi}^{3+}:\text{Eu}^{3+}$ intensiivsused on võrdlemisi stabiilsed. Samas on näha, et $m\text{-Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+}$, $m\text{-Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+} @ \text{SiO}_2$ ja $\text{YPO}_4:\text{Tb}^{3+}$ nanoosakestel toimub intensiivsuse kasv. Seda võib põhjustada objekti pinda kattev vee aur ja hapnik, mis võivad käituda luminesentsi kustutajatena [49,50].



Joonis 9. Uuritavate objektide stabiilsused kolmes erinevas punktis, viimasel joonisel on iga nanoosakese kolme mõõtmise keskmine.

Samasuguse mõõtettsükliga mõõdeti ka DAPIt, CPNi ja CdSe/CdS kvanttäppe (Joonis 10). Kõik võrdlusobjektid kaotasid aja jooksul luminesentsi intensiivsust ning tegemist ei olnud pöörduva protsessiga, kuna nende intensiivsus ei tõusnud ka pärast laseri välja lülitamist. See näitab, et haruldaste muldmetallidega dopeeritud osakesed on võrreldes kommertsiaalsete objektidega pidevale kiiritamisele vastupidavamad.

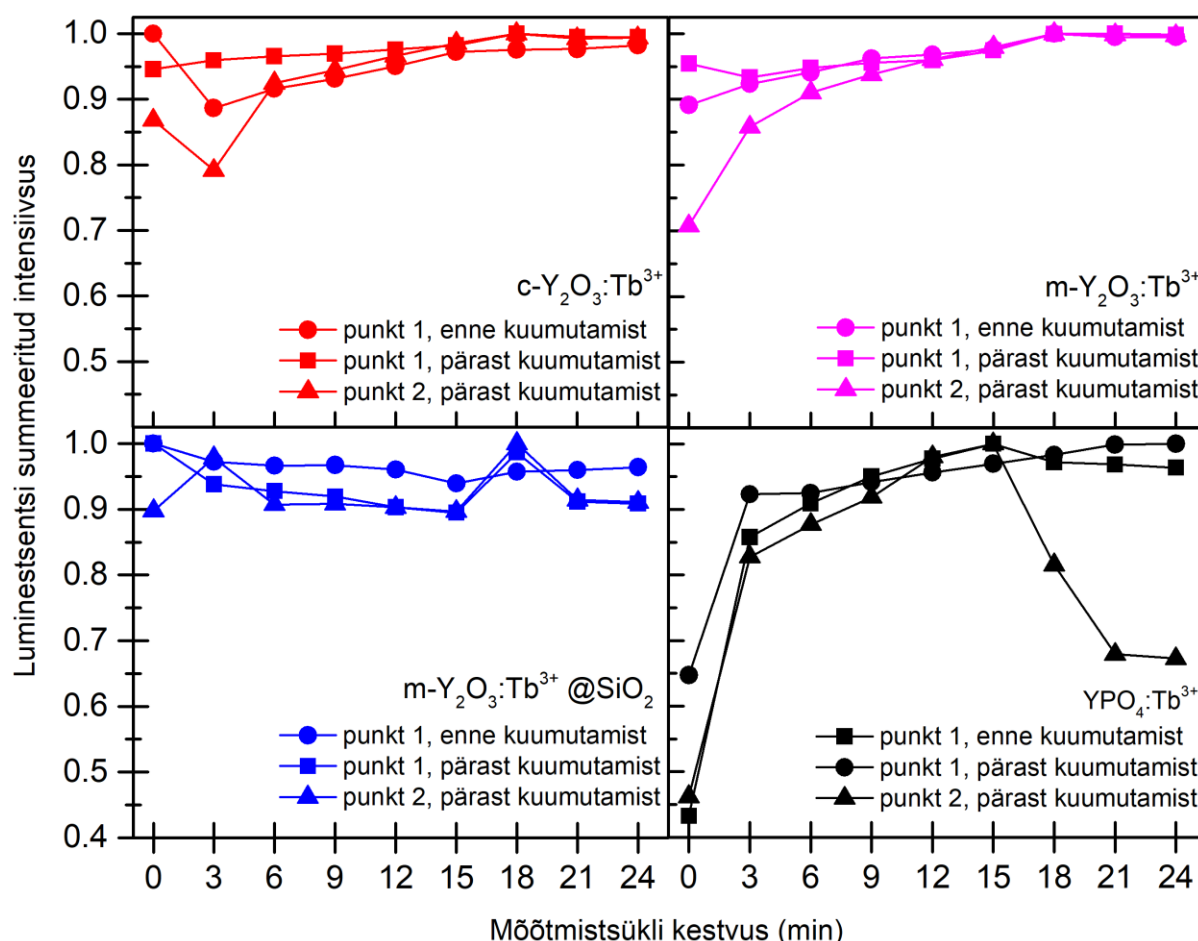


Joonis 10. Võrdlusobjektide intensiivsuste muutus mõõtettsükli jooksul.

2.5 Veeauru mõju luminesentsile

Objektide luminesentsi stabiilsust uurides nägime (Joonis 9), et $\text{YVO}_4:\text{Bi}^{3+}:\text{Eu}^{3+}$ ja $\text{c-Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+}$ osakeste intensiivsused on stabiilsed, kuid $\text{m-Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+}$, $\text{m-Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+} @\text{SiO}_2$ ja

$\text{YPO}_4:\text{Tb}^{3+}$ objektide puhul intensiivsus kasvab ajas. Üks põhjendus sellele võib olla pinnal leiduv veeaur, mis objekti laseriga kiiritamisel ära lendub [49]. Selle tõestamiseks soojendati objekte 120 kraadi Celsiuse ni samal ajal proovikambrit lämmastikuga ventileerides, jahutati ning teostati samas punktis teine mõõtmine. Pärast teist mõõtmist liiguti proovil uude punkti ning teostati kolmas mõõtmine. Selline mõõtmine tehti terbiumiga rikastatud osakestega. Tulemusena saadi kõikidest objektidest taas kolm mõõtmist (Joonis 11).



Joonis 11. Terbiumiga dopeeritud osakeste luminesentsi intensiivsus enne ja pärast soojendamist.

Katse tulemusi vaadates on näha, et $\text{m-Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+} @\text{SiO}_2$ intensiivsus on stabiilsem, kuid algne tõus on kadunud ka esmasel mõõtmisel. $\text{c-Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+}$, $\text{m-Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+}$ ja $\text{YPO}_4:\text{Tb}^{3+}$ osakeste luminesentsi intensiivsus ei ole siiski ajas stabiilne. Graafiku alguses näha olevat tõusu ei põhjusta veeaur. Seega võib hüplikuse põhjustaja olla hapnik.

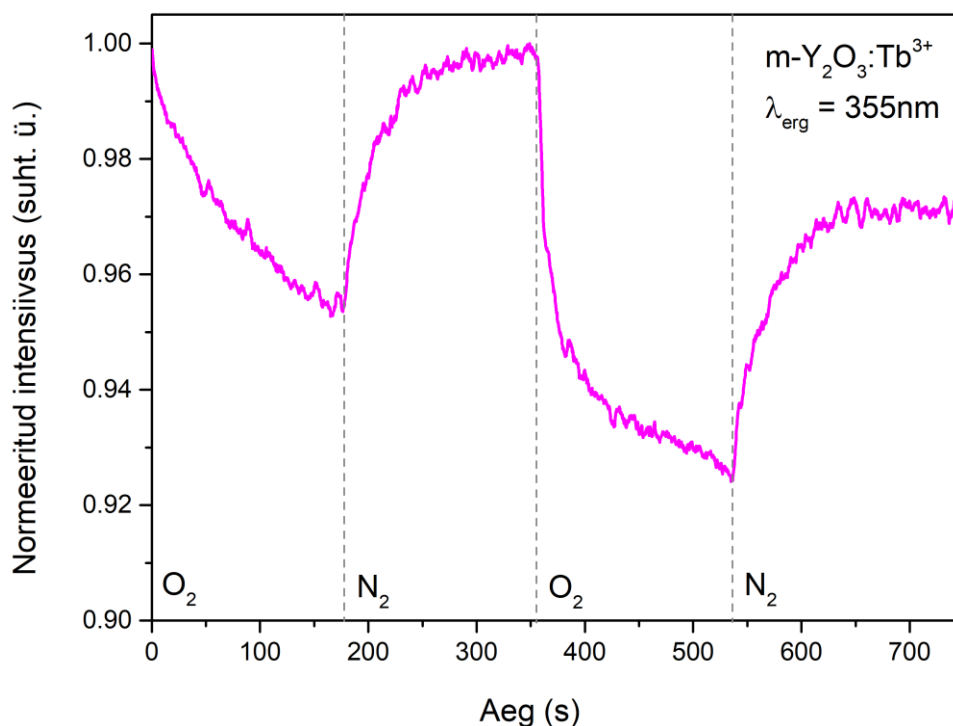
$\text{YPO}_4:\text{Tb}^{3+}$ nanoosakese mõõtmisel teises punktis pärast kuumutamist on näha, et pärast laseri varjestamist hakkab proovi intensiivsus järsult langema. Sarnane kukkumine toimus ühes punktis ka esialgsel mõõtmisel (Joonis 9), seega on alust arvata, et tegemist ei ole lihtsalt

mõõtmisveaga. Et teada saada, mis selle kukkumise taga on, tuleks objekti põhjalikumalt uurida. Kuna antud etapis pakkus huvi just graafiku esimene pool, siis katset ei korratud. c-Y₂O₃:Tb³⁺ ja m-Y₂O₃:Tb³⁺ nanoosakeste mõõtmistulemusi vaadates on näha, et esimeses punktis enne kuumutamist ja teises punktis pärast kuumutamist käitub graafik väga sarnaselt, kuid esimese punkti teiskordsel mõõtmisel graafik muutub. Seega ei ole hüplikus seotud veeauru eemaldumisega, vaid pigem fotoefektiga, näiteks hapniku eemaldumisega proovi pinnalt laseri toimel.

2.6 Hapniku mõju luminesentsile

Hapniku mõju osakeste kiirgusele uuriti puhtas hapnikus ja lämmastikus. Mõõtmised teostati m-Y₂O₃:Tb³⁺ nanoosakesega, kuna selle kiirgus oli tugevaim ning graafiku lõpp väga stabiilne kõigil mõõtmistel. Tulemustest (Joonis 12) on näha, et hapnik tõepoolest kustutab terbiumiga dopeeritud osakestes luminesentsi. Seega on teada, et terbiumiga osakeste intensiivsuse tõusu põhjustab kiiritamise käigus objektilt lahkuv hapnik.

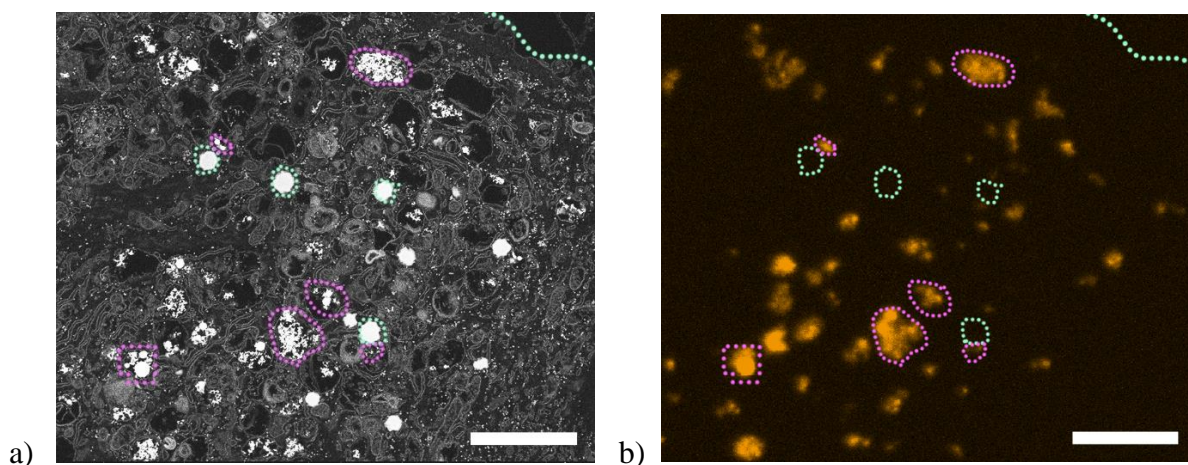
Et kasutada objekte SEM ja katoodluminesents kombinatsioonis, tuleb proov katta ja vakumeerida, mis tähendab, et pinnal olevad hapnikuosakesed luminesentsi siiski oluliselt ei mõjuta. Kui aga osakesi kasutada SEM ja FL mõõtmistel, kus tehakse esmalt õhu käes FL mõõtmine, tuleb intensiivsuse tõusuga arvestada.



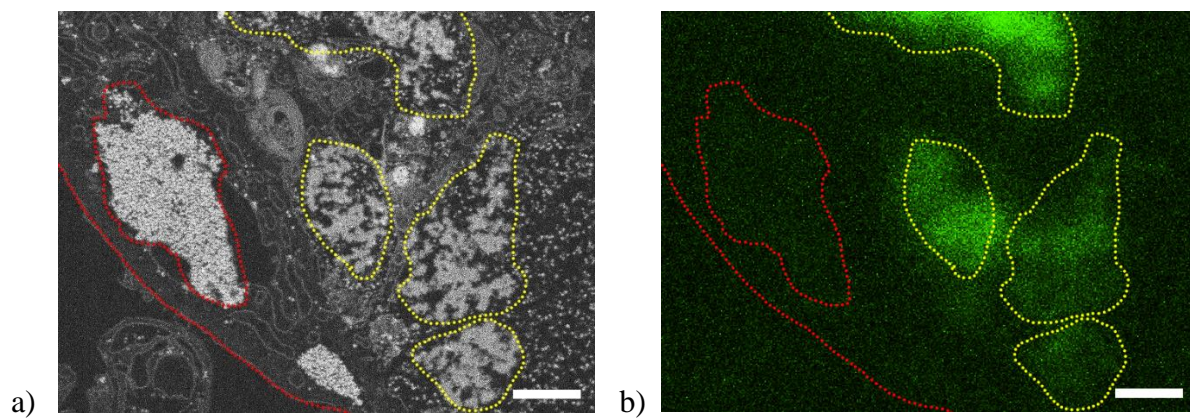
Joonis 12. m-Y₂O₃:Tb³⁺ luminesentsi intensiivsus hapniku ja lämmastiku keskkondades.

2.7 Valitud osakeste uurimine CCLEMiga

Pannes kokku uuritud nanoosakeste tulemused spektroskoopilistes uuringutes ja elektronmikroskoopias, valiti CCLEMi all uurimiseks välja $\text{YVO}_4:\text{Bi}^{3+}:\text{Eu}^{3+}$ ja $\text{m-Y}_2\text{O}_3:\text{Tb}^{3+}$. Nanoosakesed lisati inimese vaskulaarsetesse endodeeli rakkudesse. CCLEM uuringu tulemusena saadi pilt rakus olevatest alamstruktuuridest. Võrreldes Joonis 13 a ja b jooniseid on näha, et lillaga ümbritsetud alad tulevad välja nii CL kui SEM pildidil. Samas on SEM pildil näha ümaraid struktuure (rohelisega ümbritsetud), mis CL pildil välja ei tule. Sama võib täheldada Joonis 14-l, kus kollasega on tähistatud mõlema moodusega näha olevad struktuurid ning punasega katoodluminesentsil mitte kiirgav struktuur. See tähendab, et tegemist on molekulidega, millele rakku lisatud markerid funktsionaliseeritud ei ole. Seega aitab CCLEM eristada rakus naturaalseid leiduvaid struktuure sarnase kujuga nanoosakestest.



Joonis 13. $\text{YVO}_4:\text{Bi}^{3+}:\text{Eu}^{3+}$ nanoosakesed inimese vaskulaarsetes endodeeli rakkudes. a) Tagasipeegelduvate elektronide pilt ja b) katoodluminesentsi pilt. Nanoosakesed on märgitud lilla katkendliku joonega ja naturaalsed sarnased objektid rohelse katkendliku joonega. Skaala: 3 μm .



Joonis 14. $m\text{-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ nanoosakesed inimese vaskulaarsetes endodeeli rakkudes. a) Tagasipeegelduvate elektronide pilt ja b) katoodlumineestsentsi pilt. Nanoosakesed on märgitud kollase katkendliku joonega ja naturaalsed sarnased objektid punase katkendliku joonega. Skaala: 3 μm

Kokkuvõte

Töös uuriti tetragonaalse ütriumvanaadiumoksiidi ($\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$), monokliinse ütriumoksiidi ($\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$), ränioksiidiga kaetud monokliinse ütriumoksiidi ($\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+} @ \text{SiO}_2$), kuubilise ütriumoksiidi ($\text{c-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$) ja tetragonaalse ütriumfosfaadi ($\text{YPO}_4\text{:Tb}^{3+}$) nanoosakeste sobivust kombineeritud mikroskoopia luminesentsi markeritena. Lisaks tehti selgeks, millised on nende eelised ja puudused olemasolevate biomarkeritega (DAPI, CPN, CdSe/CdS) võrreldes.

XRD ja Raman mõõtmised näitasid, et nanoosakeste sünteesid ei ole veel ideaalsed. $\text{YPO}_4\text{:Tb}^{3+}$ graafikul on näha piiki, mis ei käi kokku tetragonaalse asetusega ja viitab kristallvõre deformatsioonile. Osa $\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$ sees olevast vismutist ei ole maatriksi sees, vaid on välja sadestunud. Lisaks on $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ struktuurianalüüsi graafikutel näha mõnda kuubilise struktuuri piiki. $\text{c-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ nanoosakeste Raman analüüs näitas vaid kuubilise asetusega sobivaid piike.

Objektide ergastus- ja kiirgusgraafikud näitasid, et uuritavate objektide ergastusmaksimumid on rohkem UV-piirkonnas kui võrdlusobjektidel, samas kiirguspiigid on kõigil nähtava valguse piirkonnas. Ehkki UV-piirile lähenevate ergastusmaksimumidega, on uurimisobjekte siiski võimalik optilises mikroskoopias kasutatavate laseritega ergastada. Teine oluline tähelepanek ergastus- ja kiirgusgraafikute uurimiselt on, et $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+} @ \text{SiO}_2$ ja $\text{c-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ on teistest uuritud objektidest ja võrdlusobjektidest kaks korda intensiivsemad kiirgajad.

Kineetika uuring näitas, et objektid kustuvad aeglasemalt, kui juba kasutusel olevad markerid. Samas tuleb arvestada, et mõõdeti fotoluminesentsi kustumist ning katoodluminesentsil käituvad objektid veidi teisiti.

Võrdlusobjektide stabiilsuse uurimisel oli näha, et kõigis toimub pöördumatu fotopleekimine, samas RE dopeeritud uuritavate objektide intensiivsus oli stabiilne ($\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$) või ajas kasvav ($\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+} @ \text{SiO}_2$, $\text{c-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, $\text{YPO}_4\text{:Tb}^{3+}$). Terbiumiga dopeeritud osakeste hüplikku intensiivsust põhjustas osakeste pinnal olnud hapnik, mis käitus luminesentsi kustutavalt.

Töö käigus jõuti järeldusele, et kombineeritud mikroskoobis luminesceeriva markerina kasutamiseks sobib kõige paremini $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ nanoosakesed. Need näitasid kõige stabiilsemat ja intensiivsemat kiirgust ning fotoluminesentsil võrdlemisi lühikest

kustumisaega. Pannes kokku spektroskoopiliste uuringute tulemused elektronmikroskoopia omadega, saadi tulemuseks, et CCLEMiga kasutamiseks sobivad kõige paremini $\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$ ja $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ nanoosakesed.

Antud töös saadud tulemused on osa järgmisest artiklist:

1. Kerda Keevend, Laurits Puust, Karoliine Kurvits, Lukas R.H. Gerken, Fabian H.L. Starsich, Jian-Hao Li, Martin T. Matter, Anastasia Spyrogianni, Georgios A. Sotiriou, Michael Stiefel, and Inge K. Herrmann, „Ultra-Bright and Stable Luminescent Labels for Correlative Cathodoluminescence Electron Microscopy (CCLEM) Bioimaging,“ Nano Letters, in revision

Summary

The aim of the study was to examine suitability of rare-earth (RE) doped nanoparticles ($\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$, $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+} @\text{SiO}_2$, $\text{c-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, $\text{YPO}_4\text{:Tb}^{3+}$) as luminescent biomarkers for correlated microscopy and compare them to conventional biomarkers (DAPI, CPN, CdSe/CdS).

XRD and Raman studies showed defects and impurities in synthesized nanocrystals. A mixture of different crystal structures could be found in each set of studied nanoparticles except for $\text{c-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, which showed pure cubic structure.

The excitation and emission graphs showed that the excitation peaks of the RE doped nanoparticles were more in the UV region compared to commercially available biomarkers. $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+} @\text{SiO}_2$ and $\text{c-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ showed significantly higher emission intensity compared to commercial biomarkers.

The kinetics study on the potential biomarkers showed that DAPI, CPN and CdSe/CdS decay significantly faster than RE doped nanoparticles.

All of the reference objects photobleached under constant laser light, while RE doped nanoparticles exhibited stable emission ($\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$) or even increased emission over time ($\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+} @\text{SiO}_2$, $\text{c-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$, $\text{YPO}_4\text{:Tb}^{3+}$). The increased intensity of terbium doped nanoparticles was caused by the surface-bound oxygen.

The best performing nanoparticle in photoluminescence setting was $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ that had the most stable emission, had the biggest intensity and reasonably fast decay time. For CCLEM the best performing particles were $\text{YVO}_4\text{:Bi}^{3+}\text{:Eu}^{3+}$ and $\text{m-Y}_2\text{O}_3\text{:Tb}^{3+}$ nanoparticles.

The results of this work are part of an article:

1. Kerda Keevend, Laurits Puust, Karoliine Kurvits, Lukas R.H. Gerken, Fabian H.L. Starsich, Jian-Hao Li, Martin T. Matter, Anastasia Spyrogianni, Georgios A. Sotiriou, Michael Stiefel, and Inge K. Herrmann, „Ultra-Bright and Stable Luminescent Labels for Correlative Cathodoluminescence Electron Microscopy (CCLEM) Bioimaging,” Nano Letters, in revision

Tänuavaldused

Autor soovib avaldada siirast tänu inimestele, kes aitasid selle töö valmimisel. Eelkäige tänab autor töö juhendamise ja toe eest Laurits Puusti, Kerda Keevendi ja Yury Orlovskiyt.

- [1] B. Huang, M. Bates, jt., „Super resolution fluorescence microscopy,” *Annu Rev Biochem*, 78, 993-1016 (2009).
- [2] M. W. Davidson, M. Abramowitz, „Optical microscopy,” *Encyclopedia of Imaging Science and Technology*, 1-40 (2002).
- [3] A. Kaech, „An Introduction to Electron Microscopy Instrumentation, Imaging and Preparation,” (2013), http://www.zmb.uzh.ch/static/bio407/assets/Script_AK_2014.pdf (27.05.2019).
- [4] P. Boer, J. P. Hoogenboom, jt., „Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up!,” *Nature Methods*, 12, 503-513 (2015).
- [5] R. Mayeux, „Biomarkers: Potential Uses and Limitations,” *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1, 182-188 (2004).
- [6] G. A. Sotiriou, D. Franco, jt., „Optically Stable Biocompatible Flame-Made SiO₂-Coated Y₂O₃:Tb³⁺ Nanophosphors for Cell Imaging,” *ACS Nano*, 5, 3888-3897 (2012).
- [7] A. Spyrogianni, P. Tiefenboeck, jt., „Near-UV activated, photostable nanophosphors for in vitro dosimetry and dynamic bioimaging,” *AIChE Journal*, 64, 2947-2957 (2018).
- [8] Yu. V. Orlovskii, A. S. Vanetsev, jt., „NIR fluorescence quenching by OH acceptors in the Nd³⁺ doped KY₃F₁₀ nanoparticles synthesized by microwave-hydrothermal treatment,” *Journal of Alloys and Compounds*, 661, 312-321 (2016).
- [9] S. W. Hell, „Far-Field Optical Nanoscopy,” *Science*, 316, 1153-1158 (2007).
- [10] M. G. Paez-Segala, M. G. Sun, jt., „Fixation-resistant photoactivatable fluorescent proteins for CLEM,” *Nat Methods*, 12, 215-218 (2015).
- [11] Z. Liu, L. Tian, jt., „Real-time brightfield, darkfield, and phase contrast imaging in a light-emitting diode array microscope,” *Journal of Biomedical Optics*, 19, 106002 (2014).
- [12] R. E. Connally, J. A. Piper, „Time-gated luminescence microscopy,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1130, 106-116 (2008).
- [13] M. Yu, F. Li, jt., „Laser Scanning Up-Conversion Luminescence Microscopy for Imaging Cells Labeled with Rare-Earth Nanophosphors,” *analytical chemistry*, 81, 930-935 (2009).

- [14] W. Denk, H. Horstmann, "Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy to Reconstruct Three-Dimensional Tissue Nanostructure," *Plos Biology*, 2, e329 (2004).
- [15] H. P. Erickson, „Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy,” *Biol Proced Online*, 11, 32-51 (2009).
- [16] A. Mohammed, A. Abdullah, „Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review,” in *Proceedings of 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics – HERVEX*, Băile Govora, Romania, 7-9 Nov. 2018, ISSN 1454-8003.
- [17] L. F. Kourkoutis, J. M. Plitzko, jt., „Electron Microscopy of Biological Materials at the Nanometer Scale,” *Annual Review of Materials Research*, 42, 33-58 (2012).
- [18] B. M. Collett, „Scanning Electron Microscopy: A Review And Report Of Research In Wood Science,” *Wood and Fiber Science*, 2, 113-133 (1970).
- [19] Z. L. Wang, "Transmission Electron Microscopy of Shape-Controlled Nanocrystals and Their Assemblies," *Journal of Physical Chemistry B*, 104, 1153-1175 (2000).
- [20] HORIBA Scientific, „Principles and Applications of SEM-CL (SEM-Cathodoluminescence),” AZO materials (14. juuni 2018), <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=16148> (27.05.2019).
- [21] M. B. Prigozhin, P. C. Maurer, „Bright sub-20-nm cathodoluminescent nanoprobe for electron microscopy,” *Nature Nanotechnology*, 14, 420-425 (2019).
- [22] K. Strimbu, J. A. Tavel, "What are Biomarkers?," *Curr Opin HIV AIDS*, 5, 463-466 (2010).
- [23] D. Bera, L. Qian, jt., „Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review,” *Materials (Basel)*, 3, 2260-2345 (2010).
- [24] D. Cai, X. Yuan, jt., „Phosphor geometry regulations with separated red and green quantum dot layers for high performance warm white light-emitting diodes,” *Materials Research Bulletin*, 85, 222-227 (2017).
- [25] L. C. Charbonnière, N. Hildebrandt, jt., "Lanthanides to Quantum Dots Resonance Energy Transfer in Time-Resolved Fluoro-Immunoassays and Luminescence Microscopy," *Journal of the American Chemical Society*, 128, 12800-12809 (2006).

- [26] M. M. Barroso, „Quantum Dots in Cell Biology,” *J Histochem Cytochem.*, 59, 237-251 (2011).
- [27] Y. Braeken, S. Cheruku, „Conjugated Polymer Nanoparticles for Bioimaging,” *Materials (Basel)*, 10, 1420 (2017).
- [28] D. Tuncel, H. V. Demir, „Conjugated polymer nanoparticles,” *Nanoscale*, 4, 484-494 (2010).
- [29] A. V. S. Lourenco, C. A. Kodaira, jt., “Luminescent material based on the [Eu(TTA)₃(H₂O)₂] complex incorporated into modified silica particles for biological applications,” *Journal on Inorganic Biochemistry*, 123, 11-17 (2013).
- [30] G. A. Sotiriou, M. Schneider, jt., „Green, Silica-Coated Monoclinic Y₂O₃:Tb³⁺ Nanophosphors: Flame Synthesis and Characterization,” *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*, 116, 4493-4499 (2012).
- [31] S. Wani, S. Majeed, „Rare-earth nanomaterials for bio-probe applications,” *Applied Biological Research*, 19, 241-247 (2017).
- [32] K. Keevend, L. Puust, jt., „Bright and Stable Luminescent Labels for Correlative Cathodoluminescence Electron Microscopy (CCLEM) Bioimaging,” *Nano Letters*, esitatu avaldamisele (2019).
- [33] U. Rambabu, S. Buddhudu, „Optical properties of LnPO₄:Eu³⁺ (Ln=Y, La and Gd) powder phosphors,” *Optical Materials*, 17, 401-408 (2001).
- [34] Y. T. Parabhu, K. V. Rao, jt., „X-Ray Analysis by Williamson-Hall and Size-Strain Plot Methods of ZnO Nanoparticles with Fuel Variation,” *World Journal of Nano Science and Engineering*, 4, 21-28 (2014).
- [35] A. A. Kaminskii, K. Ueda, jt., „Tetragonal vanadates YVO₄ and GdVO₄ – new efficient χ (3)-materials for Raman lasers,” *Optics Communications*, 194, 201-206 (2001).
- [36] K. Persson, Dataset: Materials Data on YVO₄ (SG:141), Materials Project, mp-19133 (2014), <https://materialsproject.org/materials/mp-19133/> (27.05.2019).
- [37] RRUFF, RRUFF ID: R070375, <http://rruff.info/Bismuth/R070375>.
- [38] K. Persson, Dataset: Materials Data on Y₂O₃ (SG:206), Materials Project, mp-2652 (2014), <https://materialsproject.org/materials/mp-558573/> (27.05.2019).

- [39] K. Persson, Dataset: Materials Data on Y₂O₃ (SG:12), Materials Project, mp-558573 (2014), <https://materialsproject.org/materials/mp-2652/> (27.05.2019).
- [40] L. Laversenne, Y. Guyot, jt., „Optimization of spectroscopic properties of Yb³⁺-doped refractory sesquioxides: cubic Y₂O₃, Lu₂O₃ and monoclinic Gd₂O₃,” *Optical Materials*, 16, 475-483 (2001).
- [41] D. den Engelsen, T. G. Ireland, jt., “Photoluminescence, cathodoluminescence and micro-Raman investigations of monoclinic nanometre-sized Y₂O₃ and Y₂O₃:Eu³⁺,” *Journal of Materials Chemistry C*, 4, 8930-8938 (2016).
- [42] K. Lee, S. Choi, jt., „Autofluorescence generation and elimination: a lesson from glutaraldehyde,” *Chem Commun*, 49, 3028-3030 (2013). (27.05.2019).
- [43] K. Persson, Dataset: Materials Data on YPO₄ (SG:141), Materials Project, mp-5132 (2014), <https://materialsproject.org/materials/mp-5132/> (27.05.2019).
- [44] K. Persson, Dataset: Materials Data on Tb₂O₃ (SG:206), Materials Project, mp-1056 (2014), <https://materialsproject.org/materials/mp-1056/> (27.05.2019).
- [45] I. Richman, „Raman Spectra of YPO₄ and YbPO₄,” *Journal of the Optical Society of America*, 56, 1589-1599 (1966).
- [46] M. Y. Roleda, C. Wiencke, jt., „Impact of ultraviolet radiation on cell structure, UV-absorbing compounds, photosynthesis, DNA damage, and germination in zoospores of Arctic *Saccorhiza dermatodea*,” *Journal of Experimental Botany*, 57, 3847-3856 (2006).
- [47] L. Ozawa, *Cathodoluminescence and Photoluminescence: Theories and Practical Applications* (CRC press, Boca Raton, 2007).
- [48] R. Pazourek, S. Nagele, jt., „Time delays in correlated photoemission processes,” *Journal of Physics: Conference Series*, 635, 012004 (2015).
- [49] R-B. Lin, S-Y. Liu, jt., „Photoluminescent Metal-Organic Frameworks for Gas Sensing,” *Adv Sci*, 3, 1500434 (2016).
- [50] M. Quaranta, S. M. Borisov, jt., „Indicators for optical oxygen sensors,” *Bioanalytical Reviews*, 4, 115-157 (2012).

Mina, Karoliine Kurvits,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Haruldaste muldmetallidega rikastatud biomarkerite optiliste omaduste uurimine” (bakalaureusetöö), mille juhendajad on Laurits Puust, Kerda Keevend ja Yury Orlovskiy,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 31.12.2019 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile,
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2019